



**PCT**  
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro  
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>A61K 47/48.</b>		<b>A3</b>	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 98/17317</b>
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 30. April 1998 (30.04.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/05790		(81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, JP, KR, MX, NO, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 21. Oktober 1997 (21.10.97)			
(30) Prioritätsdaten: 196 43 738.5 23. Oktober 1996 (23.10.96) DE		<b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): SKW TROSTBERG AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Dr.-Albert-Frank-Strasse 32, D-83308 Trostberg (DE).		(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenbe- richts: 6. August 1998 (06.08.98)	
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BAYER, Ernst [DE/DE]; Bei der Ochsenweide 17, D-72076 Tübingen (DE). FRITZ, Hans [DE/DE]; Ludwigstrasse 12, D-72072 Tübingen (DE). MAIER, Martin [DE/DE]; Mohlstrasse 60, D-72074 Tübingen (DE).			
(74) Anwälte: HANSEN, Bernd usw.; Hoffmann . Eitle, Arabellas- trasse 4, D-81925 München (DE).			
(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING BIOLOGICALLY ACTIVE POLYMER NANOPARTICLE-NUCLEIC ACID CONJUGATES			
(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON BIOLOGISCH AKTIVEN POLYMERNANOPAR- TIKEL-NUCLEINSÄURE-KONJUGATEN			
(57) Abstract			
<p>A process is disclosed for producing biologically active polymer nanoparticle-nucleic acid conjugates by polymerising vinyl monomers with a low water solubility in an aqueous solution, then reacting the resulting polymer suspensions with the nucleic acids. The process is characterised in that the vinyl monomers are emulsion polymerised in the presence of cationic radical starters but in the absence of any emulsifier. The thus obtained polymer nanoparticle-nucleic acid conjugates are sufficiently stable in biological media and are characterised by a high transport efficiency through cellular membranes.</p>			
(57) Zusammenfassung			
<p>Es wird ein Verfahren zur Herstellung von biologisch aktiven Polymernanopartikel-Nucleinsäure-Konjugaten durch Polymerisation von vinylischen Monomeren mit einer geringen Wasserlöslichkeit in wässriger Lösung und anschließender Umsetzung der entstehenden Polymersuspensionen mit den Nucleinsäuren beschrieben, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß man die Polymerisation der vinylischen Monomeren in Gegenwart von kationischen Radikalstartern und in Form einer emulgatorfreien Emulsionspolymerisation durchführt. Die auf diese Weise hergestellten Polymernanopartikel-Nucleinsäure-Konjugate weisen eine ausreichende Stabilität in biologischen Medien auf und zeichnen sich durch eine hohe Effizienz beim Transport durch zelluläre Membranen aus.</p>			

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidtschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. onal Application No  
PCT/EP 97/05790

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 A61K47/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>SUGIYAMA, KAZUO ET AL: "Adsorption of protein on the surface of thermosensitive poly(methyl methacrylate) microspheres modified with the N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide and 2-(methacryloyloxy)ethyl phosphorylcholine moieties"</p> <p>J. POLYM. SCI., PART A: POLYM. CHEM. (1997), 35(16), 3349-3357 CODEN: JPACEC; ISSN: 0887-624X, 1997, XP002066323</p> <p>see abstract</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-17

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 May 1998

Date of mailing of the international search report

16/06/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Berte, M

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/05790

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 A61K47/48

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	SUGIYAMA, KAZUO ET AL: "Adsorption of protein on the surface of thermosensitive poly(methyl methacrylate) microspheres modified with the N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide and 2-(methacryloyloxy)ethyl phosphorylcholine moieties" J. POLYM. SCI., PART A: POLYM. CHEM. (1997), 35(16), 3349-3357 CODEN: JPACEC; ISSN: 0887-624X, 1997, XP002066323 siehe Zusammenfassung	1-17



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

### \* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindnerischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindnerischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

28. Mai 1998

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

16/06/1998

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Berte, M



**PCT**  
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro  
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :</b> <b>A61K 47/48, 9/00</b>	<b>A2</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/17317</b> <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 30. April 1998 (30.04.98)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP97/05790 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 21. Oktober 1997 (21.10.97)  <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 196 43 738.5      23. Oktober 1996 (23.10.96)      DE  <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> SKW TROSTBERG AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Dr.-Albert-Frank-Strasse 32, D-83308 Trostberg (DE).  <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> BAYER, Ernst [DE/DE]; Bei der Ochsenweide 17, D-72076 Tübingen (DE). FRITZ, Hans [DE/DE]; Ludwigstrasse 12, D-72072 Tübingen (DE). MAIER, Martin [DE/DE]; Mohlstrasse 60, D-72074 Tübingen (DE).  <b>(74) Anwälte:</b> HANSEN, Bernd usw.; Hoffmann . Eitle, Arabellas- trasse 4, D-81925 München (DE).		<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AU, BR, CA, JP, KR, MX, NO, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
<b>(54) Title:</b> PROCESS FOR PRODUCING BIOLOGICALLY ACTIVE POLYMER NANOPARTICLE-NUCLEIC ACID CONJUGATES  <b>(54) Bezeichnung:</b> VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON BIOLOGISCH AKTIVEN POLYMERNANOPARTIKEL-NUCLEINSÄURE-KONJUGATEN  <b>(57) Abstract</b> <p>A process is disclosed for producing biologically active polymer nanoparticle-nucleic acid conjugates by polymerising vinyl monomers with a low water solubility in an aqueous solution, then reacting the resulting polymer suspensions with the nucleic acids. The process is characterised in that the vinyl monomers are emulsion polymerised in the presence of cationic radical starters but in the absence of any emulsifier. The thus obtained polymer nanoparticle-nucleic acid conjugates are sufficiently stable in biological media and are characterised by a high transport efficiency through cellular membranes.</p> <b>(57) Zusammenfassung</b> <p>Es wird ein Verfahren zur Herstellung von biologisch aktiven Polymernanopartikel-Nucleinsäure-Konjugaten durch Polymerisation von vinyllischen Monomeren mit einer geringen Wasserlöslichkeit in wässriger Lösung und anschließender Umsetzung der entstehenden Polymersuspensionen mit den Nucleinsäuren beschrieben, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß man die Polymerisation der vinyllischen Monomeren in Gegenwart von kationischen Radikalstartern und in Form einer emulgatorfreien Emulsionspolymerisation durchführt. Die auf diese Weise hergestellten Polymernanopartikel-Nucleinsäure-Konjugate weisen eine ausreichende Stabilität in biologischen Medien auf und zeichnen sich durch eine hohe Effizienz beim Transport durch zelluläre Membranen aus.</p>		

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

5                   Verfahren zur Herstellung von biologisch aktiven  
                  Polymernanopartikel-Nucleinsäure-Konjugaten

Beschreibung

10 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur  
Herstellung von biologisch aktiven Polymernanopartikel-  
Nucleinsäure-Konjugaten und deren Verwendung zum Gentransfer  
bzw. zur Kontrolle der Genexpression.

15 Die Verwendung von Nucleinsäuren und Nucleinsäure-Derivaten,  
wie z.B. von synthetisch hergestellten Oligodesoxynucleotiden  
und deren Derivaten zur Steuerung der Genexpression  
(Antisense-Strategie) oder von DNA-Fragmenten und Plasmiden  
zum Gentransfer, machen einen wirksamen Transport durch  
20 zelluläre Membranen erforderlich. Des weiteren sollten die  
Nucleinsäuren gegen enzymatischen Abbau geschützt sein und in  
ausreichender Konzentration ihren Zielort in der Zelle  
(Zellkern, mRNA im Zytoplasma) erreichen, um die gewünschte  
Wirkung zu gewährleisten.

25 Kolloidale Trägersysteme werden seit langem für den Transport  
von biologisch bzw. therapeutisch wirksamen Substanzen  
verwendet, wobei an das Trägersystem folgende Anforderungen  
gestellt werden:

- 30 - kleine Partikelgröße, die deutlich unterhalb der Größe von  
Zellstrukturen (Durchmesser kleiner als 1  $\mu$ m) liegt
- hohe Beladungskapazität
- niedrige Toxizität
- Möglichkeit zur Oberflächenmodifizierung
- Steuerung des Zielortes durch Variation von Größe bzw.
- 35 Oberflächeneneigenschaften
- kontrollierte Freisetzung der adsorptiv gebundenen  
Substanzen

- keine Nebenwirkungen durch Trägermaterial, Abbauprodukte oder Hilfsstoffe

Der Einsatz von synthetisch hergestellten Polymerpartikeln im nm-Bereich zur adsorptiven Anbindung von Nucleinsäuren ist bspw. in der FR-A 2,649,321 beschrieben. Hierbei werden Poly(alkylcyanoacrylate) durch die adsorptive Anbindung von niedermolekularen, hydrophoben Kationen mit einer positiven Oberflächenladung versehen, um eine Anlagerung von negativ geladenen Oligodesoxyribonucleotiden über ionische Wechselwirkungen zu ermöglichen. Nachteilig bei diesem System ist die Tatsache, daß die rein adsorptive Bindung niedermolekularer Kationen wenig stabil ist und sowohl die verwendeten hydrophoben Kationen, als auch die Abbauprodukte des Polymergrundkörpers toxische Eigenschaften aufweisen können.

Gemäß der EP-A 430 517 wird die Herstellung von Biomosaikpolymeren in Form von Membranen, Filmen oder Partikeln mittels Emulsionspolymerisation beschrieben, wobei die Polymerisation im wesentlichen in Gegenwart einer oberflächenaktiven Substanz (ionisches oder nichtionisches Tensid) sowie einer biologisch aktiven Substanz (wie z.B. Nucleinsäuren) erfolgt und das biologisch aktive Material irreversibel in den Polymergrundkörper einpolymerisiert bzw. an dessen Oberfläche gebunden wird.

Schließlich ist aus der WO 96/24 377 eine partikuläre Arzneiform bekannt, die aus kationischen Polymernanopartikeln und Peptiden bzw. modifizierten oder nichtmodifizierten Nucleinsäuren bestehen. Als Polymergrundkörper fungieren hierbei Partikelmischpolymere auf Basis von Acrylsäuren, Acrylsäureestern sowie Methacrylsäureestern. Die Einführung der zur Anbindung der Wirkstoffe erforderlichen funktionellen kationischen Gruppen erfolgt durch den Einsatz von entsprechend modifizierten Comonomeren, die protonierbare bzw. alkylierbare Aminfunktionen besitzen. Diese



- ladungstragenden Monomerbausteine werden in beliebigen Mischungsverhältnissen mit dem entsprechend unmodifizierten Monomer in einer radikalischen oder ionischen Polymerisationsreaktion umgesetzt. Ganz abgesehen davon, daß
- 5 diese Monomerbausteine aufwendig herzustellen sind, treten aufgrund der vorhandenen Unterschiede in der Löslichkeit und Reaktivität dieser Monomere bei der Herstellung dieser Mischpolymere häufig inhomogene Produkte auf.
- 10 Der vorliegenden Erfindung lag daher die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Herstellung von Polymernanopartikel-Nucleinsäure-Konjugaten zu entwickeln, welches die genannten Nachteile entsprechend dem Stand der Technik nicht aufweist, sondern in einfacher, kostengünstiger und gut
- 15 reproduzierbarer Weise die Herstellung homogener Polymernanopartikel-Nucleinsäure-Konjugate ermöglicht, die eine ausreichende Stabilität in biologischen Medien aufweisen und die sich durch eine hohe Effizienz beim Transport durch zelluläre Membranen auszeichnen.
- 20 Diese Aufgabe wurde erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß man eine Polymerisation von vinylischen Monomeren mit einer geringen Wasserlöslichkeit in Gegenwart von kationischen Radikalstartern in Form einer emulgatorfreien
- 25 Emulsionspolymerisation durchführt und anschließend die entstehenden Polymersuspensionen mit den Nucleinsäuren umsetzt.
- Es hat sich nämlich überraschenderweise gezeigt, daß die so
- 30 erzeugten Materialien sich durch eine hohe Nucleinsäure-Beladung sowie durch eine ausreichende Stabilität gegen enzymatischen Abbau auszeichnen. Außerdem können diese Konjugate durch viele Parameter in ihren Eigenschaften variiert werden, wie z. B. Polymergrundkörper, Partikelgröße,
- 35 Oberflächenmodifizierung, Nucleinsäuremodifizierung etc., was ebenfalls nicht vorhersehbar war. Von den Konjugaten gemäß der WO 96/24 377 sind die erfindungsgemäßen Konjugate dadurch

verschieden, daß sie kationische Gruppen praktisch ausschließlich an den Kettenenden der jeweiligen Polymerketten, aus denen das Polymer-Nanopartikel besteht, enthalten, nicht aber im Inneren der Polymerkette.

5

Das Verfahren entsprechend der vorliegenden Erfindung umfaßt also in der Regel zwei Stufen. In der ersten Stufe erfolgt die Herstellung des Polymergrundkörpers in an sich bekannter Weise, indem man vinylische Monomere in wäßrigem

10 Dispersionsmedium einer emulgatorfreien

Emulsionspolymerisation unterwirft. Die vinylischen Monomere sollten hierbei eine geringe Wasserlöslichkeit aufweisen, die vorzugsweise < 20 g/l betragen sollte. Beispiele für solche vinylische Monomere sind Styrol, Acrylsäure- oder

15 Methacrylsäure- Derivate. Bevorzugte (Meth)acrylsäure-

Derivate sind Alkyl(meth)acrylate (mit einem Alkylrest von 1 bis 8 C-Atomen) sowie N-Alkyl- oder Dialkylacrylamide, wie z. B. N-Butylmethylacrylamid, N-Isobutylmethylacrylamid oder N-Octylmethylacrylamid.

20

Es ist als erfindungswesentlich anzusehen, daß die Emulsionspolymerisation, die vorzugsweise bei Temperaturen von 20 bis 100 °C durchgeführt wird, ohne den Zusatz von Emulgatoren erfolgt und daß die Oberflächenladung des

25 Polymergrundkörpers allein durch die Verwendung ionischer Radikalstarter induziert wird. Hierbei haben sich vor allem kationische Initiatoren mit basischen Endgruppen, wie z. B. 2,2'-Azobis(2-amidinopropan)dihydrochlorid (AIBA) oder 2,2'-Azobis(2-(2-imidazolin-2-yl)propan)dihydrochlorid (AIBI)

30 bewährt.

Aufgrund der Tatsache, daß keine zusätzlichen Fremdstoffe wie Emulgatoren oder Stabilisatoren dem Ansatz hinzugefügt werden, ist eine aufwendige Abtrennung dieser Stoffe in einem

35 nachfolgenden Reinigungsschritt nicht erforderlich.

Da in wäßrigem Dispersionsmedium gearbeitet wird, gestaltet sich der Herstellungsprozeß des polymeren Grundkörpers als besonders kostengünstig. Vorzugsweise wird der Polymerisationsschritt in Form eines Batch-Prozesses durchgeföhrt, dessen Up-Scaling keine Schwierigkeiten bereitet, da Schwankungen in der Temperaturföhrtung sowie die gewählte Röhrttechnik nur einen geringen Einfluß auf die Eigenschaften des Endproduktes haben. Je nach gewählter Monomer- und Initiatorkonzentration des Reaktionsansatzes weisen die Polymerteilchen nach der Emulsionspolymerisation eine Teilchengröße von vorzugsweise 10 bis 1000 nm und eine Oberflächenladung von 0,1 bis 10 C/g Polymer auf.

Die erhaltenen Polymersuspensionen sind auch bei Raumtemperatur über mehrere Monate lagerfähig, so daß irgendwelche Agglomerationen nicht zu beobachten sind. Die weiteren Vorteile dieser polymeren Trägermaterialien sind ihre hohe Stabilität in biologischen Medien und geringe Toxizität im gewünschten Anwendungsbereich.

Vor der Umsetzung der Polymersuspensionen mit den Nucleinsäuren werden gemäß einer bevorzugten Ausführungsform sowohl die Polymersuspensionen als auch die Nucleinsäuren bspw. durch Zentrifugation oder Diafiltration aufgereinigt. Bei der bevorzugten Diafiltration kann auf die üblichen Dialyseverfahren und Membranen zurückgegriffen werden.

Darüber hinaus ist es im Rahmen der vorliegenden Erfindung noch möglich, daß man den Polymersuspensionen nach der Polymerisation Stabilisatoren in einer Menge von vorzugsweise 0,01 bis 5 Gew.-% bezogen auf das Gewicht der Suspension zusetzt, um auf diese Weise eine zusätzliche sterische Stabilisierung der Polymersuspension zu erreichen. Als Stabilisatoren werden hierzu vorzugsweise biologisch inerte, nicht-ionische Blockcopolymere mit hydrophoben und hydrophilen Anteilen eingesetzt. Beispiele für solche Stabilisatoren sind Poloxamere oder Poloxamine.

Die eigentliche Umsetzung der Polymersuspensionen mit den Nucleinsäuren entsprechend der zweiten Stufe des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt vorzugsweise bei  
5 Temperaturen von 10 bis 30 °C und einem pH-Wert < 11, wobei allerdings die zur Anbindung verwendeten Nucleinsäuren in deprotonierter Form vorliegen sollten. Als Nucleinsäuren kommen hierbei bspw. Desoxyribonucleotide, Ribonucleotide oder chemisch modifizierte Desoxyribonucleotide und  
10 Ribonucleotide mit 7 bis 40 Nucleotideinheiten in Frage. Darüber hinaus können jedoch auch ohne weiteres Plasmide als Nucleinsäuren verwendet werden.

Die bei der Umsetzung entstehenden erfindungsgemäßen  
15 Polymernanopartikel-Nucleinsäure-Konjugate, welche durch den Nucleinsäureanteil eine gewisse negative Überschußladung aufweisen, können gemäß einer bevorzugten Ausführungsform in einer Art Sandwich-Komplex zusätzlich mit Peptiden, Proteinen mit einem isoelektrischen Punkt > 7 oder Polyethylenimin  
20 modifiziert werden. Die Beladungskapazität des Trägermaterials mit Nucleinsäure bzw. Peptiden oder Proteinen wird durch den Zusatz von sterischen Stabilisatoren nicht beeinflusst. Die effektiv gebundene Nucleinsäure- bzw. Peptid- oder Proteinmenge kann durch Abzentrifugation der  
25 Polymernanopartikel-Nucleinsäure-Konjugate und Messung der im Überstand vorhandenen überschüssigen ungebundenen Substratmenge leicht bestimmt werden.

Die erfindungsgemäßen Polymernanopartikel-Nucleinsäure-  
30 Konjugate eignen sich aufgrund ihrer biologischen Aktivität hervorragend zum Gentransfer sowie zur Kontrolle der Genexpression.

Als Testsystem zur Untersuchung der Effizienz der  
35 erfindungsgemäßen Polymernanopartikel-Nucleinsäure-Konjugate dienten Rattenhepatozyten, deren Multiple Drug Resistance- (mdr-) Gen durch den Einsatz von Antisense Oligonucleotiden

inhibiert werden sollte. Überraschenderweise kann die Konzentration an anti-mdr Phosphorthioat-Oligonucleotiden bei den Konjugaten im Vergleich zu den freien Oligonucleotiden um den Faktor 10 herabgesetzt werden, um die gleiche Wirkung zu erzielen. Noch deutlicher wird der Unterschied bei Verwendung von nucleaselabilen Phosphordiester-Oligonucleotiden, die nur im Falle der erfindungsgemäßen Konjugate überhaupt eine Wirkung zeigen, da sie in der Konjugatform vor enzymatischem Abbau geschützt sind. Aufgrund ihrer höheren Spezifität und Biokompatibilität stellen jedoch gerade die unmodifizierten, natürlichen DNA-Fragmente eine interessante Variante in der Antisense-Strategie dar.

Auch die erfindungsgemäßen Polymernanopartikel-Nucleinsäure-Konjugate in Form von Plasmiden eignen sich hervorragend zum Gentransfer. Zur Untersuchung der Beladungskapazität und Wirksamkeit zum Gentransfer wurden Plasmide, die  $\beta$ -Galactosidase-Gene als leicht nachweisbare Expressionskontrollen enthalten, eingesetzt. Die Beladungskapazität (in  $\mu\text{g}$  DNA/mg Polymer) lag etwa um den Faktor 4 höher als bei kurzen Oligonucleotid-Fragmenten.

Die besonderen Vorteile der erfindungsgemäßen Polymernanopartikel- Nucleinsäure-Konjugate bestehen im wesentlichen darin, daß bei der Herstellung weder die Verwendung von ionischen Comonomeren noch der Einsatz von hydrophoben Kationen als Ladungsträger erforderlich ist, da die negativ geladenen Nucleinsäuren direkt von den geladenen Endgruppen auf der Partikeloberfläche elektrostatisch gebunden werden. Nebenwirkungen in biologischen Systemen, insbesondere bei Zellkulturexperimenten, die häufig bei Verwendung von biologisch abbaubaren Trägermaterialien oder adsorptiv gebundenen Hilfsstoffen auftreten, sind im vorliegenden Fall minimal, da außer den gebundenen Nucleinsäuren bzw. Peptiden keine biologisch wirksamen Substanzen freigesetzt werden. Wie Bioverträglichkeitstests an Rattenhepatozyten zeigen, liegt die LDH-Ausschüttung als

Assay für die Zytotoxizität bspw. für Polystyrol bei Konzentrationen von 1 g Polymer/l Inkubationsmedium nach 20 Stunden nur um 5 % höher als bei der unbehandelten Kontrolle.

- 5 Die erfindungsgemäßen Polymernanopartikel-Nucleinsäure-Konjugate und deren Komplexe mit basischen Peptiden oder Proteinen stellen somit ein neues und effizientes System zur  
in vitro-Kontrolle der Genexpression (Antisense-Strategie)  
dar. Ferner können sie in vielfältiger Weise als Vektoren zur  
10 Gentransfektion eingesetzt werden. So lassen sich durch Variation der Größe, Art und Oberflächenladung des polymeren Nanopartikel-Grundkörpers durch Wahl der wirksamen Nucleinsäure-Komponente und deren Derivatisierung sowie durch  
die Modifikation der Oberfläche mittels basischer Peptide  
15 oder Polyethylenimin die Polymernanopartikel-Nucleinsäure-Systeme auf die jeweiligen Anforderungen der biologischen Testsysteme anpassen.

Die nachfolgenden Beispiele sollen die Erfindung näher  
20 veranschaulichen.

### Beispiele

#### Beispiel 1

- 25 In einem 100 ml Rundkolben, versehen mit KPG-Rührer, Rückflußkühler, Argoneinlaß- und -auslaßvorrichtungen werden 40 ml Reinstwasser und 2,5 ml zuvor unter Schutzgas (Argon) frisch destilliertes Styrol gegeben und unter Durchleiten  
30 eines Argonstroms intensiv durchmischt. Dem Ansatz werden 50 mg 2,2'-Azobis(2-amidinopropan)dihydrochlorid (AIBA), gelöst in 5 ml H<sub>2</sub>O, zugefügt und das Reaktionsgefäß in ein auf 80 °C temperiertes Ölbad getaucht und bei einer Rührerdrehzahl von 360 U/Min. gerührt. Nach ca. 10 Min. ist eine milchig weiße  
35 Trübung des Reaktionsansatzes zu erkennen. Nach 24 Stunden wird auf Raumtemperatur abgekühlt. Man erhält eine Polymersuspension mit einem Feststoffgehalt von 42 g/l und

- einem Teilchendurchmesser von 400 bis 500 nm, die eine weitgehend monodisperse Größenverteilung der Partikel aufweist. Das Material wird über einen Zeitraum von 7 Tagen mittels einer Dialysemembran (SpectraPor; MWCO: 10000; Fa. Roth, Karlsruhe) gegen Reinstwasser dialysiert, um im Dispersionsmedium gelöstes Polymer und Restmonomerspuren zu entfernen. Das aufgereinigte Produkt weist einen Feststoffgehalt von 40 g/l und eine konduktometrisch bestimmte Partikelladung von 750 mC/g Polymer auf.
- 10 Nach der Phosphoramidit-Methode synthetisch hergestelltes Phosphorothioat-Oligodesoxynucleotid 20mer der Sequenz 5' CCC TGC TCC CCC CTG GCT CC 3' (ODN-1;  $M_w$ : 6207 g/mol) wird mittels präparativer HPLC aufgereinigt und nach Abspaltung
- 15 der Dimethoxytritylschutzgruppe mittels einer sterilen Dialysemembran (SpectraPor CE; MWCO: 500; Fa. Roth, Karlsruhe) gegen Reinstwasser über einen Zeitraum von 7 Tagen dialysiert.
- 20 200  $\mu$ l der Polymersuspension (8 mg Polymer) werden mit 100 ng (16 nmol) Phosphorothioat-Oligonucleotid (ODN-1), gelöst in Reinstwasser, über einen Zeitraum von 12 bis 24 Stunden inkubiert. Man erhält ein Polymernanopartikel-Oligonucleotid-Konjugat mit einem Nucleinsäureanteil von 1,7  $\mu$ mol
- 25 Oligonucleotid/g Polymer (10,6 mg Nucleinsäure/g Polymer).

Die Bestimmung der Beladungskapazität erfolgt nach dem nachfolgend beschriebenen Verfahren:

- 30 Nach der Inkubation der Nanopartikel mit der Nucleinsäure wird das Konjugat abzentrifugiert (14 000 g, 2 x 45 Min.) und die Menge an ungebundener Substanz im Überstand mittels UV-Messung bestimmt. Die adsorptiv gebundene Substanzmenge wird durch die Differenz zur Ausgangsmenge an Nucleinsäure bzw.
- 35 Peptid berechnet.

Beispiel 2

Der Polymerisationsansatz und die Aufreinigung des Produktes erfolgt analog zu Beispiel 1. Dabei werden jedoch 1,5 ml Styrol eingesetzt. Man erhält eine Polymersuspension mit einem Feststoffgehalt von 23 g/l. Die Partikel weisen Teilchendurchmesser von 150 bis 400 nm auf. Nach der Dialyse liegt der Feststoffgehalt bei 22 g/l und die Partikelladung bei 1080 mC/g.

Nach Inkubation von 100 µl der Polymersuspension (2,2 mg Polymer) mit 23,8 ng (5,3 nmol) Phosphordiester-Oligonucleotid 15mer der Sequenz 5' TTC TTG TCT GCT CTT 3' (ODN-2;  $M_w$ : 4491 g/mol) analog zu Beispiel 1 erhält man ein Polymernanopartikel-Oligonucleotid-Konjugat mit einem Nucleinsäureanteil von 2,0 µmol Oligonucleotid/g Polymer (8,9 mg Nucleinsäure/g Polymer).

Beispiel 3

Analog zu Beispiel 1 wird zu 80 ml H<sub>2</sub>O und 3 ml Styrol eine Lösung von 118 mg 2,2'-Azobis(2-(2-imidazolin-2-yl)propan)dihydrochlorid (AIBI) in 10 ml Wasser gegeben und bei 80°C über einen Zeitraum von 24 Stunden durchpolymerisiert. Die erhaltene Polymersuspension hat einen Feststoffgehalt von 23,9 g/l und besteht aus Partikeln mit einem mittleren Teilchendurchmesser von 150 bis 200 nm, die eine weitgehend monodisperse Größenverteilung aufweist. Der Feststoffgehalt beträgt nach der Dialyse über einen Zeitraum von 21 Tagen 22,7 g/l und die Partikelladung 930 mC/g. Da die mit AIBI hergestellten Polymerpartikel eine höhere Oberflächenladung und eine höhere Beladungskapazität aufweisen, bilden solche Partikel die besten Konjugate mit Nucleinsäuren und stellen daher nach gegenwärtigem Kenntnisstand der Erfinder die beste Ausführungsform der Erfindung dar.



- Die Toxizität der Polymersuspension (stabilisiert mit einer wäßrigen Lösung von 0,1 % (w/v) Poloxamer 338 (Fa. ICI Chemicals; Manchester, UK); Dichte nach der Stabilisierung: 9,56 g/l) bei Rattenhepatozyten, bestimmt über die LDH-Ausschüttung, beträgt nach 20 Stunden 81 Einheiten im Gegensatz zu 77 Einheiten der unbehandelten Kontrolle (1 g Polymer/l Inkubationsmedium).
- 10 Nach Inkubation von 200  $\mu$ l der stabilisierten Polymersuspension (4,5 mg Polymer) mit 72,7 ng (16,2 nmol) ODN-2 analog dem Verfahren zu Beispiel 1 erhält man ein Polymernanopartikel-Oligonucleotid-Konjugat mit einem Nucleinsäureanteil von 3,0  $\mu$ mol Oligonucleotid/g Polymer
- 15 (13,5 mg Nucleinsäure/g Polymer).

#### Beispiel 4

- 20 Die Inkubation von 200  $\mu$ l der aufgereinigten und stabilisierten Polymersuspension aus Beispiel 3 mit 76,4 ng (16,2 nmol) des Phosphorothioat-Oligodesoxynucleotids ODN-3 ( $M_w$ : 4716 g/mol; Sequenz analog zu ODN-2 in Beispiel 2) ergibt ein Polymernanopartikel- Oligonucleotid-Konjugat mit
- 25 einem Nucleinsäureanteil von 3,1  $\mu$ mol Oligonucleotid/g Polymer (14,6 mg Nucleinsäure/g Polymer; Bestimmung analog zu Beispiel 1).

- Die Inhibition der *mdr*-Genexpression der Polymernanopartikel-ODN-3-Konjugate wird mittels mRNA-Bestimmung (Northern Plot) und *mdr*-Protein-Bestimmung (Western Plot) an Rattenhepatozyten untersucht. Die Polymernanopartikel-Oligonucleotid-Konjugate werden in Konzentrationen von 0,032, 0,096, 0,32 und 0,96 g Polymer/l Inkubationsmedium (0,1, 0,3, 1 bzw. 3  $\mu$ mol ODN-3/l Inkubationsmedium) eingesetzt. Bei
- 35 einer Konzentration von 1  $\mu$ mol ODN-3/l Inkubationsmedium kann der mRNA-Gehalt um 90 % und der Protein-Gehalt um 50 %

verringert werden. Mit freiem Oligonucleotid wird der gleiche Inhibitionseffekt erst bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{mol}$  ODN-3/1 Inkubationsmedium erzielt. Kontrolloligonucleotide (ODN-4; Sequenz: 5' CCT GTT GTT TTC TCT 3' bzw. ODN-5; Sequenz: 5' AAG AGC AGA CAA GAA 3') zeigen sowohl in freiem Zustand als auch in der Konjugatform mit Nanopartikeln bei den verwendeten Konzentrationen keinerlei Effekte.

#### 10 Beispiel 5

Zur Untersuchung der Ansatzgröße der Polymerisation auf die Eigenschaften des Endproduktes wurde der Reaktionsansatz von Beispiel 3 um das Fünffache erhöht. Die Charakterisierung des aufgereinigten Materials ergab in Bezug auf Teilchengröße, Größenverteilung, Oberflächenladung und Beladungskapazität an Nucleinsäure keine nennenswerten Unterschiede zu den Ergebnissen aus Beispiel 3 (Feststoffgehalt nach der Dialyse: 23,8 mg; Partikelladung: 1 020 mC/g Polymer; Nucleinsäureanteil: 3,4  $\mu\text{mol}$  ODN-3/g Polymer bzw. 16,0 mg ODN-3/g Polymer; Bestimmung analog zu Beispiel 1).

#### Beispiel 6

Bei Inkubation von 50  $\mu\text{l}$  der stabilisierten Polymersuspension aus Beispiel 3 mit 22  $\mu\text{g}$  pcMVß-Plasmid gelöst in 100  $\mu\text{l}$  Reinstwasser erhält man ein Polymernanopartikel-Plasmid-Konjugat mit einem Nucleinsäureanteil von 42 mg Nucleinsäure/g Polymer. Das Konjugat wird 12 bis 24 Stunden mit 2,6  $\mu\text{g}$  (0,95 nmol) des Peptids Penetratin (Homeodomain-Sequenz;  $M_W$ : 2720,2 g/mol; Derossi, D., Joliot, A.H., Chassaing, G., Prochiantz, A., *J.Biol.Chem.* 1994, 269 (14), 10444-10450) inkubiert. Die Bestimmung der Beladungskapazität von Plasmid bzw. Peptid erfolgt analog zu Beispiel 1.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von biologisch aktiven  
Polymernanopartikel- Nucleinsäure-Konjugaten durch  
5 Polymerisation von vinylischen Monomeren mit einer  
geringen Wasserlöslichkeit in wäßriger Lösung und  
anschließender Umsetzung der entstehenden  
Polymersuspensionen mit den Nucleinsäuren, dadurch  
gekennzeichnet, daß man die Polymerisation der vinylischen  
10 Monomeren in Gegenwart von kationischen Radikalstartern  
und in Form einer emulgatorfreien Emulsionspolymerisation  
durchführt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die  
15 vinylischen Monomere eine Wasserlöslichkeit von < 20 g/l  
aufweisen.
3. Verfahren nach den Ansprüchen 1 und 2, dadurch  
gekennzeichnet, daß als vinylische Monomere Styrol,  
20 Acrylsäure-Derivate, Methacrylsäure- Derivate oder  
Mischungen davon eingesetzt werden.
4. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch  
gekennzeichnet, daß man kationische Radikalstarter mit  
25 basischen Endgruppen, wie z. B. 2,2'-Azobis(2-  
amidinopropan)di-hydrochlorid (AIBA) oder 2,2'-Azobis(2-  
(2-imidazolin-2-yl)propan)di-hydrochlorid (AIBI),  
verwendet.
- 30 5. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch  
gekennzeichnet, daß man die Emulsionspolymerisation bei  
Temperaturen von 20 bis 100 °C durchführt.
6. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch  
35 gekennzeichnet, daß die Polymerteilchen nach der  
Emulsionspolymerisation eine Teilchengröße von 10 bis 1000  
nm aufweisen.

Beispiel 7

Der Polymerisationsansatz entspricht dem in Beispiel 3,  
jedoch werden 2 ml Styrol eingesetzt. Das Rohprodukt besitzt  
5 einen Feststoffgehalt von 10,4 g/l und weist eine  
polydisperse Verteilung der Teilchendurchmesser von 50 bis  
200 nm auf. Nach der Aufreinigung mittels Dialyse über einen  
Zeitraum von 10 Tagen beträgt der Feststoffgehalt 8,2 g/l und  
die Partikelladung 2190 mC/g.

7. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Polymersuspensionen vor der Umsetzung mit Nucleinsäuren bspw. durch Zentrifugation  
5 oder Diafiltration aufgereinigt werden.
8. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Umsetzung der Polymersuspensionen mit den Nucleinsäuren bei Temperaturen von 10 bis 30 °C  
10 und einem pH-Wert < 11 erfolgt.
9. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß man als Nucleinsäuren Desoxyribonucleotide, Ribonucleotide oder chemisch  
15 modifizierte Desoxyribonucleotide und Ribonucleotide mit 7 bis 40 Nucleotid-Einheiten einsetzt.
10. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß man als Nucleinsäuren Plasmide  
20 verwendet.
11. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß den Polymersuspensionen nach der Polymerisation Stabilisatoren in einer Menge von 0,01 bis  
25 5 Gew.-% bezogen auf das Gewicht der Suspension zugesetzt werden.
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß man als Stabilisatoren nichtionische Block-Copolymere mit  
30 hydrophoben und hydrophilen Anteilen einsetzt.
13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß man als nichtionische Block-Copolymere Poloxamere oder Poloxamine verwendet.  
35
14. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Polymernanopartikel-Nucleinsäure-

Konjugate mit Peptiden, Proteinen mit einem isoelektrischen Punkt  $> 7$  oder Polyethylenimin modifiziert werden.

- 5 15. Polymernanopartikel-Nucleinsäure-Konjugate, erhältlich nach einem Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche.
- 10 16. Verwendung Polymernanopartikel-Nucleinsäure-Konjugate gemäß Anspruch 15 zum Gentransfer.
17. Verwendung der Polymernanopartikel-Nucleinsäure-Konjugate gemäß Anspruch 15 zur Kontrolle der Genexpression.